

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類 C12N 15/12, C07K 14/82, 16/18, C12N 1/21, 5/16, 15/11, C12P 21/02, C12Q 1/68, G01N 33/53, 33/574 // (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:91) (C12P 21/02, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO99/00495
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02214		(43) 国際公開日 1999年1月7日 (07.01.99)
(22) 国際出願日 1997年6月26日 (26.06.97)		
(71) 出願人 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 Osaka, (JP)		(81) 指定国 JP, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(72) 発明者 岸本利彦(KISHIMOTO, Toshihiko) 〒244 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会社 横浜製作所内 Kanagawa, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
田村隆明(TAMURA, Taka-aki)[JP/JP] 牧野泰孝(MAKINO, Yasutaka)[JP/JP] 〒263 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 千葉大学理学部生物学科内 Chiba, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英國際特許事務所 Tokyo, (JP)		

(54) Title: NOVEL PROTEIN REMARKABLY EXPRESSED IN HEPATIC CANCER, GENE ENCODING THE SAME, ANTIBODY THERETO, AND METHOD FOR DETECTING THE EXPRESSION THEREOF

(54) 発明の名称 肝癌において顕著に発現される新規な蛋白質、それをコードする遺伝子、それに対する抗体、並びに該発現を検出する方法

(57) Abstract

A novel protein (HRPI) showing increased expression in the course of carcinogenesis; a novel gene encoding this protein; the antisense gene of this gene; an antibody to the above-mentioned protein; and a method for monitoring hepatic cancer by using the above-mentioned protein, gene or antibody. Genes specifically expressed in rat hepatic cancer are extracted and one showing increased expression in hepatic cancer is isolated. After preparing its cDNA of the full length, the base sequence of this gene is determined to confirm that this gene is one specific to hepatic cancer. The amino acid sequence encoded by the above-mentioned gene is determined and a protein having this amino acid sequence is expressed in a recombinant *Escherichia coli*. Further, an antibody to the protein is prepared. By using this antibody, it has been clarified that the onset of hepatic cancer can be monitored by detecting the expression of the above-mentioned protein and detecting the above-mentioned gene.

(57)要約

本発明は、発癌過程で発現が増加する新規な蛋白質（H R P I）、該蛋白質をコードする新規な遺伝子、該遺伝子のアンチセンス遺伝子及び該蛋白質に対する抗体の提供を目的とする。また、本発明は、上記蛋白質、上記遺伝子又は上記抗体を用いて肝癌のモニター方法を提供することを目的とする。本発明は、ラット肝癌に特異的に発現している遺伝子を抽出し、肝癌で発現が増加する遺伝子を単離し、完全長のcDNAを得て、該遺伝子の塩基配列を決定し、該遺伝子が肝癌特異的な遺伝子であることを確認した。

さらに、上記遺伝子がコードするアミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列を有する蛋白質を組み換え体大腸菌に発現させた。

また、上記蛋白質に対する抗体を作製した。

そして、上記抗体を用いて、上記蛋白質の発現を検出すること、及び上記遺伝子を検出することで肝癌の発症のモニターが可能であることを明らかにした。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英國	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルガリア・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダッド・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴー	IL	イスラエル	NE	ニジエール	VN	ヴィエトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴースラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	չչչչ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スードン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン				

明細書

肝癌において顕著に発現される新規な蛋白質、それをコードする遺伝子、それに対する抗体、並びに該発現を検出する方法

技術分野

本発明は、肝癌において発現が顕著な蛋白質、該蛋白質をコードする遺伝子、該蛋白質に対する抗体、並びに該蛋白質又は該遺伝子の発現を検出する方法に関する。

背景技術

癌の発症は遺伝子の何らかの異常によって起こることが知られており、特に、遺伝子の転写レベルでの変動異常が癌の発症の主たる原因と考えられている（『Science』Vol. 222、1983年、pp 765～771）。癌の発症機構の解明のため、発癌過程で発現状態が変化する蛋白質およびそれをコードする遺伝子、または、組織間で発現状態が変化する蛋白質およびそれをコードする遺伝子の取得は1980年頃よりさかんに行われてきた。例えば、癌組織を生化学的に分析し正常組織との違いを探し出すことで取得された癌特異的な蛋白質である α -フェトプロテインやCEAの存在が知られている。

これらの物質の同定には、癌組織に対するモノクローナル抗体を作製し、得られたモノクローナル抗体の中から、癌組織にのみ反応する抗体を選別し、次いでこのモノクローナル抗体に反応する抗原となるべき物質を同定していく方法が用いられてきた。

これらの方法により得られる情報は、ほとんどが蛋白質に関するもので、遺伝子は直接には得られない。そのため得られた蛋白質からの遺伝子の取得は、遺伝子工学的な手法を用いて、遺伝子ライブラリーと呼ばれる遺伝子の集団から選択

する方法が用いられていた。

具体的には、この選択方法は、『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年) chapter 8, 9, 12に示されるように、得られた蛋白質の情報をもとに遺伝子プローブと呼ばれるものを作製し、この遺伝子プローブに対応する遺伝子を遺伝子ライブラリーよりコロニー／ブラークハイブリダイゼーションという方法により取得するものである。

また、同書 chapter 8, 9, 11, 12にはモノクローナル抗体を用いて遺伝子ライブラリーから目的とする遺伝子をスクリーニングする方法が示されている。

しかしながらこれらの方法を用いることでは、目的とする蛋白質が量的に多いこと、あるいは、モノクローナル抗体を用いる場合には抗原蛋白質が細胞表面のものでありかつ抗原性の高いものであることが必要条件となっているため、これらに該当しない蛋白質は、取得することが非常に困難であり、従ってその蛋白質をコードする遺伝子の取得も非常に困難であった。

本発明は、以上説明した従来のいくつかの公知の方法ではなく、全く異なる方法を用いることで、肝癌組織での発現が正常肝組織に比べて上昇している遺伝子を単離するものである。

すなわち、本発明者は、国際出願公開番号W097/10333号において、発癌過程で発現が増加する新規な蛋白質、該蛋白質をコードする新規な遺伝子としてH R P I 遺伝子を開示した。

しかし、その後H R P I 遺伝子の塩基配列及びH R P I 蛋白質のアミノ酸配列に誤りがあることが判明した。本発明は正しいアミノ酸配列からなるH R P I 蛋白質、該蛋白質をコードする遺伝子及び該蛋白質に対する抗体の提供を目的とするものである。

発明の開示

本発明者は、前記の目的を達成するために、鋭意検討を重ねた結果、サブトラクション法を用いてラット肝癌に特異的に発現している遺伝子を抽出し、ドットスクリーニング法を用いて肝癌で発現が増加する遺伝子を単離した。そして、肝癌 cDNA ライブラリーから該遺伝子の完全長の cDNA を得て、該遺伝子の塩基配列を決定した。さらに、該遺伝子がコードするアミノ酸配列を決定した。

また、ノーザンプロットハイブリダイゼーション法により該 cDNA が肝癌特異的な遺伝子であることを確認した。さらに、該 cDNA がコードする蛋白質を組み換え体大腸菌に発現させ、該蛋白質が天然物と同じ機能を有することを確認した。

上記の手段により、肝癌に特異的な新規なラットの蛋白質 HRP I 及び該蛋白質をコードする遺伝子を単離した。

さらに、上記蛋白質を該蛋白質が由来する種以外のヒトを除く哺乳動物に免疫し、該蛋白質に対する抗体を作製し、該蛋白質の抗原性を確認した。

また、上記の遺伝子がラットの各組織からノーザンプロットハイブリダイゼーション法により検出されることを見いだした。

そして、これらの知見より、前記抗体を用いて前記蛋白質の発現を検出することにより、癌、特に肝癌の発症及び進行程度のモニタが可能であることを明らかにした。また、前記蛋白質をコードする遺伝子を検出することで癌、特に肝癌の発症、及び進行程度のモニタが可能であることを明らかにした。

図面の簡単な説明

図 1 A 及び 1 B は、実施例 1 で肝癌からサブトラクション法により得た遺伝子ライブラリーから抽出した DNA をメンプランに固定し、ドットプロットスクリーニングを行った結果を表す図である。図 1 A は、肝癌 poly A RNA より作製した cDNA プローブでスクリーニングを行った結果を表す図であり、図 1

Bは、正常肝臓polyA RNAより作製したcDNAプローブでスクリーニングした結果を表す図である。矢印1は、肝癌で発現の増加する遺伝子のドットであり、矢印2は、肝癌で発現の増加する遺伝子のドットである。

図2は、正常肝臓及び肝癌のmRNAについて、HRPI遺伝子をプローブとしてノーザンプロットハイブリダイゼーション法による解析を行った結果を表す図である。レーン1は、正常肝臓のmRNAのレーン、レーン2は、DEN投与12時間後の肝臓のmRNAのレーン、レーン3は、DEN投与24時間後の肝臓のmRNAのレーン、レーン4は、DEN投与48時間後の肝臓のmRNAのレーン、レーン5は、DEN投与1カ月後の肝癌のmRNAのレーン、レーン6は、DEN投与3カ月後の肝癌のmRNAのレーン、レーン7は、DEN投与5カ月後の肝癌のmRNAのレーン、レーン8は、DEN投与7カ月後の肝癌のmRNAのレーンであり、矢印9は、HRPI mRNAのバンドの位置を表す。

図3は、実施例4で使用したpET3aベクターを表す図である。

図4は、組み換え体HRPI部分蛋白質についてSDS-PAGE電気泳動を行った結果を表す図である。レーン1は、組み換え体大腸菌で作製された蛋白質のレーン、レーン2は、精製組み換え体HRPI部分蛋白質のレーンであり、矢印3は、HRPI部分蛋白質のバンドの位置を表している。

図5は、実施例5で使用したpBluebacIIIベクターを表す図である。

図6は、組み換え体HRPIをSDS-PAGE電気泳動を行った結果を表す図である。レーン1は、野生のSf9細胞が発現する蛋白質のレーン、レーン2は、組み換え体Sf9細胞が発現する蛋白質のレーンであり、矢印3は、組み換え体HRPIのバンドの位置を表している。

図7A及び7Bは、HRPI全長蛋白質を含む試料と抗HRPI抗体とを反応させウェスタンプロット解析を行った結果を表す図である。図7Aは、組み換え体HRPI全長蛋白質を含む試料と抗HRPI抗体とを反応させウェスタンプロット解析を行った結果を表す図であり、図7Bは、ラット肝臓抽出液と抗HRP

I 抗体とを反応させウェスタンプロット解析を行った結果を表す図である。図 7 A 中のレーン 1 は、組み換え体 H R P I を泳動したレーンであり、レーン 2 は、肝癌組織抽出液を泳動したレーンであり、矢印 3 は組み換え体 H R P I のバンドの位置を表す。図 7 B 中の、レーン 4 は、正常肝臓抽出液を泳動したレーンであり、レーン 5 は、D E N 投与 7 カ月後の肝癌抽出液を泳動したレーンであり、矢印 6 は H R P I のバンドの位置を表す。

図 8 は、H R P I 遺伝子の各臓器での発現を表す図である。レーン 1 は、心臓の m R N A を泳動したレーン、レーン 2 は、脳の m R N A を泳動したレーン、レーン 3 は、脾臓の m R N A を泳動したレーン、レーン 4 は、肺の m R N A を泳動したレーン、レーン 5 は、肝臓の m R N A を泳動したレーン、レーン 6 は、骨格筋の m R N A を泳動したレーン、レーン 7 は、腎臓の m R N A を泳動したレーン、レーン 8 は、精巣の m R N A を泳動したレーンであり、矢印 9 は、H R P I m R N A のバンドの位置を表している。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、肝癌組織での発現が正常肝組織に比べて上昇している蛋白質、それらをコードする遺伝子、それらに特異的な抗体並びに、それらの蛋白質及び遺伝子を検出することによるガンのモニター方法である。

本発明の特徴は、以下の通りである。

1. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である。
2. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されているアミノ酸配列からなり、かつ該蛋白質の肝臓組織における発現が、正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴とする蛋白質である。
3. サブトラクション法によって検出されるるレベルにて、該蛋白質をコードする m R N A が正常細胞に比べてガン細胞において増加していることを特徴と

する前記2に記載の蛋白質である。

4. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるDNAである。

5. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列を含んでなるDNAであって、かつ該DNAが該蛋白質の全部をコードするRNAとハイブリダイズすることを特徴とするDNAである。

6. 配列表の配列番号2で表される塩基配列を含むDNAである。

7. 配列表の配列番号2で表される塩基配列の25番目のAから912番目のAまでの塩基配列を含むDNAである。

8. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

9. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

10. 配列表の配列番号2で表される塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

11. 配列表の配列番号4で表される塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNAである。

12. 化学修飾された前記4～11のいずれか一つに記載のDNAである。

13. 前記4～11のいずれか一つに記載のDNAのアンチセンスDNAである。

14. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるRNAである。

15. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるRNA

である。

16. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する16塩基以上から成り、且つGC含有率が30～70%であるRNAである。

17. 化学修飾された前記14～16のいずれか一つに記載のRNAである。

18. 前記14～16のいずれか一つに記載のRNAのアンチセンスRNAである。

19. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質に特異的に反応する抗体である。

20. 前記1～3のいずれかに記載の蛋白質を検出する方法であって、前記19に記載の抗体を用いる方法である。

21. 哺乳動物の組織中に存在する前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質を前記19に記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法である。

22. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする前記21に記載のガンの検出方法である。

23. 前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを検出する方法であって、前記4～12のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いることを特徴とする検出方法である。

24. 哺乳動物の組織中に存在する前記1～3のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするRNAを前記4～12のいずれか一つに記載のDNAをプローブとして用いて検出することを特徴とする、ガンの検出方法である。

25. 該哺乳動物の組織が肝臓組織であることを特徴とする前記24に記載のガンの検出方法である。

本発明は、肝癌において特異的に発現される蛋白質及びそれをコードする遺伝子である。それらは、後述の実施例中で開示しているように、ラットの肝臓から、

サブトラクション法により肝癌に特異的に存在する遺伝子を単離し、塩基配列を決定することより取得された。さらに、前記得られた遺伝子より、肝癌において特異的に発現される蛋白質が確認され、単離された。

本願発明者らは、肝癌に特異的な蛋白質を、ラットH R P Iと命名した。それらの蛋白質のアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子配列を、配列表の配列番号1及び2に示す。

異種間の同一機能の蛋白質については、種によってそのアミノ酸配列にいくらかの相違はあるが、30%～40%以上のホモロジーがあることが一般的に知られている。従って、本発明において単離した蛋白質（H R P I）についても、該蛋白質と同じ機能を有し、かつ該蛋白質とのホモロジーが30%以上（好ましくは40%以上）である蛋白質をラット以外の哺乳動物も有していることは充分考えられる。なお、ここで意味するホモロジーがあるということは、一般的に、同族アミノ酸をポジティブとカウントする算出法によるものであり、アミノ酸鎖の長さが異なる場合は、アミノ酸鎖が短い方の蛋白質の長さに対して、ホモロジーがある部分の割合がいくらかを表すものである。

したがって、本発明に係る蛋白質は以下の2点の特徴を有するものを意味する。

①肝臓組織において、肝癌における発現が正常細胞における発現に比べて顕著に増加していること。

②配列表に記載の塩基配列と30%以上、好ましくは40%以上のホモロジーを有すること。さらに、この特徴は、由来する動物の種によらないものである。

ここで、肝癌で特異的にみられる（発現する）かどうかについては、種々の公知の方法が使用可能であるが、例えば後で記載する実施例に示した方法を用いて確認することも好ましい方法である。

自然の変異により又は人工の変異（例えば、『Molecular Cloning 2nd Edition』（Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年）15. 1～15. 113頁を

参照)によりポリヌクレオチドの構造の一部を変化させることができあり、これにより該ポリヌクレオチドがコードする蛋白質を変異させることができある。本発明の蛋白質についても、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の1又は2以上のアミノ酸が置換、欠失又は付加された変異体蛋白質を作製することができる。本発明の蛋白質は、該蛋白質に対する抗体により特異的に認識されるものであるので、本発明の変異体蛋白質は、該抗体により認識されること(該抗体により認識される程度に変異させたものであること)を特徴とする。

本発明にかかる、H R P Iをコードする遺伝子は、上で定義したH R P Iをコードする遺伝子である。

本発明は、前記の蛋白質、即ちH R P Iの抗原性について、実施例に例示するように、該蛋白質が由来する種以外でありかつヒト以外の哺乳動物に免疫することで容易に抗体が得られるものであることを明らかにするものである。したがって、本発明のH R P Iに対する抗体はそれぞれ、同様の方法、すなわち該蛋白質が由来する種以外の動物に免疫感作することにより得られる抗血清及びポリクローナル抗体をその範囲内に含む。また、免疫原として、蛋白質の一部であっても該蛋白質の一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものを用いることも当業者にとってはよく用いられる方法である。該蛋白質の一部は、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。なお、蛋白質の一部としては、免疫原として充分作用させるために、8アミノ酸残基以上であることが好ましい。

また、抗原性が明らかとなった物質については、免疫感作によってポリクローナル抗体が得られるならば、該免疫した動物のリンパ球を用いたハイブリドーマによりモノクローナル抗体を産生可能である(例えば、『Antibodies A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) Chapter 6を参照)。したがって本発明のH R P Iに対する抗体とはポリクローナル抗体及び

モノクローナル抗体をその範囲内に含むものである。

H R P I の検出については、抗体を用いる方法、さらに酵素反応を利用した酵素反応を用いる方法、それぞれの遺伝子を検出する方法が挙げられる。

抗体を用いる方法としては具体的には、①前記各蛋白質に対する抗体を用いて該蛋白質を検出する方法、②前記各蛋白質に対する抗体および該抗体の標識二次抗体を用いて、該蛋白質を検出する方法が挙げられる。標識としては、例えば放射性同位元素 (R I) 、酵素、アビジン又はビオチン、もしくは蛍光物質 (F I T C やローダミン等) が利用される。

酵素反応を利用した抗体を用いる方法としては、例えば、E L I S A が挙げられる。

また、遺伝子を検出する方法としては具体的には、ノーザンプロットハイブリダイゼーション法やR T - P C R 法 (『Current Protocols in Molecular Biology』 (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience) Chapter 15) 又はインサイチュハイブリダイゼーション法 (同書Chapter 14) が挙げられる。

なお、ハイブリダイズの条件は、プローブの長さや使用するメンブランにより最適な条件が異なることが知られており、該条件の設定については、当業者にとって容易に選択可能である。

本発明の実施例では、使用したメンブランの性質と、得ようとしたプローブの長さにおける最適な条件を開示するものであり、メンブランやプローブの長さが異なれば当然異なるハイブリダイズ条件でもハイブリダイズし得る。例えば、ピロリン酸ナトリウムがなくてもハイブリダイズする場合もある。1 つの好適な実施の態様は以下のとくである。

ハイブリダイズ条件：

①プレハイブリダイゼーション条件

5～10×SSC (SSC溶液の各成分の濃度が5～10倍である)

5～10×Denhardt's

1M以下のピロリン酸ナトリウム (pH 6.8)

30～50%のホルムアミド

0.1～1%のSDS

約100μg/ml酵母tRNA

約100μg/ml熱変性DNA

反応温度35ないし42°C

反応時間50分以上1時間10分以下

②ハイブリダイゼーション条件

5～10×SSC

5～10×Denhardt's

1M以下のピロリン酸ナトリウム (pH 6.8)

30～50%ホルムアミド

1%以下のSDS

約100μg/ml酵母tRNA

約100μg/ml熱変性DNA

1×10⁵ないし2×10⁶ cpm/ml cDNAプローブ

反応温度35ないし42°C

反応時間12時間以上20時間以下

なお、上記の条件のうち、ピロリン酸ナトリウム (pH 6.8)、又はSDSは特にバックグラウンドに基づく改良のために主に使用している。また、これらの遺伝子の検出のために用いるプローブはDNAでもRNAでもどちらでも用いることができる。

さて、ヒトのゲノムの塩基数は3×10⁹個といわれている。16塩基のDNAは4¹⁶種類存在するので、この長さのDNAがあればヒトの蛋白質を全て識別

できることになる。

すなわち、プローブとして必要な長さは理論的には 1-6 塩基である。実用上もこの長さ以上であることが望ましいことは言うまでもないが、実用的には、合成効率、操作性その他の点より 1-2 塩基以上のものが用いられることが多い。また、プローブとして用いる箇所は非コード領域、コード領域のいずれも使用可能である。

また、プローブとして用いる箇所は、G C 含有率が 30 ~ 70 % であれば、非コード領域、コード領域のいずれも使用可能である。

本発明のアンチセンス DNA 又はアンチセンス RNA (以下両者を合わせてアンチセンスポリヌクレオチドということがある。) には、塩基、リン酸、糖からなるヌクレオチドが複数結合したものが、天然には存在しないものを含めて全て含まれる。

また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド誘導体には、その立体構造や機能がポリヌクレオチドと類似するものが全て含まれる。例えば、ポリヌクレオチドの 3' 末端もしくは 5' 末端に他の物質が結合したものやポリヌクレオチドの塩基、糖、リン酸の少なくともいずれか一部において、置換や欠失や付加の修飾が生じた物質、天然に存在しないような塩基、糖、リン酸を有するものや、糖-リン酸骨格以外の骨格を有するものである。

該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体は、本発明の肝癌において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチドのいかなる部分にハイブリダイズするものであってもよい。なお、該蛋白質の全部又は一部をコードする mRNA の一部に対して相補的な塩基配列を有し、該 mRNA にハイブリダイズするものが好ましい。特に好ましくは、少なくとも H R P I をコードする mRNA にハイブリダイズするものである。

また、該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体は、組織や細胞における本発明の肝癌において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチドの

存在やその発現状況を調べるための研究用ポリヌクレオチドプローブとして、直ちに使用可能である。また、診断用ポリヌクレオチドプローブとしても使用可能である。なお、プローブとしては、12塩基以上且つG C含有率が30ないし70%であるものが好ましく、16塩基以上且つG C含有率が30ないし70%であるものが、特に好ましい。

また、該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体を使用して、本発明の肝癌において発現が増加する蛋白質の発現を調節することが可能である。これらは該蛋白質をコードする遺伝子もしくはmRNAにハイブリダイズして該蛋白質の発現を抑制することが期待されるので、該蛋白質が関与する機能の異常に基づく疾患の治療薬として使用可能である。すなわち、該アンチセンスポリヌクレオチドやその誘導体よりアンチセンス医薬品を開発することが可能である。

現在一般に、アンチセンスポリヌクレオチド誘導体の例は、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも1つが高められた誘導体であることが好ましいことが知られている。特に好ましくは、当該ポリヌクレオチド誘導体は、fosfotioate結合を骨格構造として有する誘導体であることが知られている。本発明のポリヌクレオチド及びその誘導体についても、これらの機能又は構造を有する誘導体が含まれる。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド誘導体の製造方法については、例えば、『in Antisense Research and Applications』(CRC出版、フロリダ、1993年)に記載の方法を用いることが可能である。

例えば、天然型のDNAやRNAであれば、化学合成機による方法、又は本発明の肝癌において発現が増加する蛋白質をコードする遺伝子を鋳型とするPCR法により本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを得ることができる。また、メチルfosfotioate型やfosfotioate型等、誘導体の中には、化学合成機(例えば、パーキンエルマージャパン社製394型)を使用して合成でき

るものもある。この場合には、化学合成機に添付されている説明書にしたがって操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することによっても、目的のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を得ることができる。

DNA又はRNAを化学合成・酵素合成するときに、側鎖をメチル化すること、あるいはビオチン化すること、もしくはリン酸基部分のOをS置換すること等の化学的に修飾することはよく知られている。

化学合成時に導入できる修飾として、例えば、1) ビオチン化、2) メチル化、3) ジコクシゲニン化、4) 脱リン酸化、5) 蛍光標識化（フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドおよびその誘導体）、6) アミノ化、7) リン酸基のSをOに置換したDNA、RNAの合成が主として挙げられる。

また、酵素的に導入できる化学修飾としては、例えば、1) ビオチン化、2) メチル化、3) ジコクシゲニン化、4) 脱リン酸化、5) リン酸化、6) 蛍光標識化（フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドおよびその誘導体）、7) 酵素標識化（アルカリリフォスファターゼ）が主に挙げられる。

例えば、配列表の配列番号2に記載のDNAを化学合成するときに、上記の化学修飾を行い、配列表に示されたDNAそのものと異なるものを合成することが可能である。したがって、本発明のDNA及びRNAは、該化学修飾されたDNA及びRNAをその範囲に含むものである。

HRPIの検出による癌の進行程度のモニターについては、被験者から採取した組織又は細胞中に該蛋白質が存するかを調べることにより行える。また、HRPIが細胞外に分泌又は放出される場合には、被験者の血液中のHRPIの有無を調べることにより癌の進行程度のモニターが可能である。具体的には、前記のHRPIの検出方法（抗体を用いる方法、酵素反応を利用した抗体を用いる方法、それぞれの遺伝子を検出する方法）と同様に行えばよい。

また、遺伝子による癌の進行程度のモニターについては、被験者から採取した

組織又は細胞中に該遺伝子が存するかを調べることにより行える。遺伝子の検出方法は、前記のようにノーザンプロットハイブリダイゼーション法やR T - P C R法、インサイチュハイブリダイゼーション法が挙げられる。

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳述するが、本発明はこの例に限定されるものではない。

(実施例 1) 肝癌で発現が増加する蛋白質及びその遺伝子

I. 肝癌で発現の増加する蛋白質をコードする遺伝子の単離

1. 肝癌ラットの作製

肝癌ラットは、ソルトーファーバー法 (『Nature』 Vol. 263、1976年、pp 701～703) を基として作製した。実際には、5週齢のウイスター系ラット (船橋農場製) にジエチルニトロサミン (DEN) を腹腔内投与し、二週間後2-アミノアセチルフルオレン (AAF) を0.02%含むM飼料 (オリエンタル酵母製) の経口投与を開始し、さらにその一週間後再生肝手術を施した。DEN投与後12, 24, 48時間及び1, 3, 5, 7ヶ月後に肝臓を摘出し、後のRNA調製に使用した。

また比較対照として、正常な増殖を示す再生肝臓を、再生肝手術後12, 24, 48時間後に肝臓を摘出することで用意し、のちの解析に使用した。

2. RNAの調製

全RNAは、『Methods in enzymology』 Vol. 154 (academic Press Inc.、1987年) pp 3～28に記載の方法を基として調製した。実際には、

(1) 各肝臓を3gずつ液体窒素中で粉碎し、100mlの5.5M GTC溶液 (グアニジンチオシアネート5.5mM、N-ラウロニルサルコシン0.5%、25mMクエン酸ナトリウム、pH 7.0) に加え、ポッター型ホモジナイザーでホモジネートした。

(2) 溶液を、3000 rpm、10分間遠心分離した後、上清液を SW28

スイングローター用遠心管（ベックマン製）に加えておいた比重1.6 g/mlのセシウムトリフルオロ酢酸溶液（セシウムトリフルオロ酢酸（ファルマシア製）50%、100 mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）（pH 7.0））12 mlに重層し、SW28スイングローターを用いて25000 rpm、24時間、15°Cで分離を行った。

(3) 沈殿物を、600 μlの4M GTC溶液に溶かし、15000 rpmで遠心分離し、溶液部分を回収した。1M酢酸を15 μl、エタノール450 μlを加え、15000 rpm、10分間遠心分離し、沈殿を回収した。

(4) この沈殿を、適量（約3 ml）のTE溶液（1 mM Tris-Cl（pH 7.5）、1 mM EDTA）に溶かし（溶けるまでTE溶液を加えた）、15000 rpmで遠心分離し、溶液部分を回収した。

(5) 溶液と同量のフェノール／クロロホルムを混合し、15000 rpm、10分間遠心分離し、溶液部分を回収した。

(6) 溶液に1/10容量の3M酢酸ナトリウム（pH 5.2）を加え、2.5倍量のエタノールを加え、-20°Cで20分間放置後、15000 rpmで遠心分離し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、乾燥させ、適量のTE溶液に溶かし、-80°Cで保存した。各肝臓から5~7 mgの全RNAが得られた。

(7) polyA RNAは、oligotex dT30 superTM（日本ロッシュ製）を用いて、取扱い説明書の通りに行った。用いた全RNAの量は一回当たり1 mgで、oligotex dT30 superTMを750 μlを用いてpolyA RNAの精製を行った。各肝臓において、1 mgの全RNAから約20 μgのpolyA RNAが得られた。

3. cDNAサブトラクション

これは、原らの方法（『Analytical Biochemistry』Vol. 214、1993年、pp 58~64）に準じて行った（この文献は引用することにより本明細書の一部である）。

(1) 用いた材料となるpolyA RNAは、7ヶ月肝癌、及び正常肝臓のもので、各15μgを用いた。

①該polyA RNAは、それぞれoligotex dT30 superTMに吸着させた後、その状態でcDNAの合成反応を行った。合成反応の条件は文献の通りに行った。

②肝癌のcDNA-oligotex dT30 superTMには、ターミナルデオキシトランスフェラーゼ(宝酒造製)でpoly dC tailを付加し、EcoRI-(dG)₁₅プライマーとTaqポリメラーゼ(パーキンエルマー製)でセンス鎖のcDNAを合成した。

このセンス鎖cDNAと正常肝臓のcDNA-oligotex dT30 superTMの間で該cDNAサブトラクション反応を行った。

③反応後得られたcDNA溶液はEcoRI-(dG)₁₅及びXbaI-(dT)30の両プライマーを用いてPCR反応(『Current Protocols in Molecular Biology』(1987年、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience社) Chapter 15に記載の方法に準じて増幅した。PCRの条件は、以下の組成の溶液で、1サイクルを94°Cで90秒、次に55°Cで2分、次に72°Cで3分反応させることとして、25サイクル行った。

cDNA溶液	69μl
10xTaq緩衝液(パーキンエルマー製)	10μl
1. 25mM dNTP	16μl
EcoRI-(dG) ₁₅ プライマー(2μg/μl)	2μl
XbaI-(dT) ₃₀ プライマー(2μg/μl)	2μl
Taqポリメラーゼ(パーキンエルマー製)(5u/μl)	1μl
	計100μl

(2) ①サブトラクション処理後、得られた遺伝子ライブラリーをEcoRI

(宝酒造製)で切斷した。反応系は次の条件とした。

遺伝子溶液	10 μ l
10 x H buffer	10 μ l (宝酒造製)
Eco RI	5 μ l (宝酒造製)
滅菌水	75 μ l
	計 100 μ l

反応温度 37°C

反応時間 一晩

②Eco RI切斷後、100 μ lのフェノール／クロロフォルムを混合し、15000 rpmで遠心分離し、水溶液部分を回収した。この溶液に10 μ lの3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加え、250 μ lのエタノールを加えた後、15000 rpmで遠心分離し沈殿を回収した。

③回収した沈殿を70%エタノール1mlで洗浄し、乾燥させた後、75 μ lの滅菌水に溶解させた。これを下記組成の液として37°Cで一晩反応させ、Xho Iで切斷した。

遺伝子溶液	75 μ l
1% BSA	10 μ l (宝酒造製)
10 x H buffer	10 μ l (宝酒造製)
Xho I	5 μ l (宝酒造製)
	計 100 μ l

反応温度 37°C

反応時間 一晩

(3) 100 μ lのフェノール／クロロホルムを混合し、15000 rpmで遠心分離し、水溶液部分を回収した。この溶液に10 μ lの3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加え、250 μ lのエタノールを加えた後、15000 rpmで遠心分離し沈殿を回収し、70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し乾燥した

後、100 μ lの滅菌水に溶解させ、遺伝子ライブラリー溶液を調製した。

4. サブトラクション後の遺伝子のベクターへの導入

(1) pBluescript IIベクター(ストラタジーン製)をEcoR I, Xba I(宝酒造製)で切断した。切断条件は、3. (2)で示した条件を用いた。

(2) 切断されたpBluescript IIベクターの切断端の脱リン酸化をbacterial alkaline phosphatase(宝酒造製)を用いて、65°Cで1時間反応させて行った後、100 μ lのフェノール／クロロホルムを混合し、15000 rpmで遠心分離し、水溶液部分を回収した。

(3) この溶液に10 μ lの3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加え、250 μ lのエタノールを加えた後、15000 rpmで遠心分離し沈殿を回収し、70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し乾燥した後、100 ng/ μ lになるよう滅菌水に溶解させた。

(4) 3. で得られた遺伝子ライブラリー溶液と、切断、脱リン酸化を行ったpBluescript IIベクターをligation packTM(日本ジーン製)の使用要領に従い、混合、反応させることでライブラリーの各遺伝子をベクターに挿入した。

5. サブトラクション後の遺伝子の大腸菌への導入

常法に従い、4. (4)で反応させた反応液を全て、E. coli JM109のコンピテントセル(宝酒造製)に混合し、氷上で30分間、42°Cで45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC培地900 μ lを加え、37°C、1時間置き、ベクターをE. coli JM109に導入した。その後、E. coli JM109を回収した。

6. 遺伝子の抽出

(1) この大腸菌を、下記の組成のLB寒天培地に撒き、一晩培養することでコロニーを形成させた。

L B 寒天培地の組成

アンピシリン（和光純薬製）100 μ g/ml

I P T G (宝酒造製) 0.1 mM

X-gal (宝酒造製) 0.004%

形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを選択して後の遺伝子のスクリーニングに用いる種菌とした。

(2) 種菌を2000種類選択し、各々をアンピシリンを100 μ g/ml含む2mlのL B液体培地で培養した後、『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年) Chapter 1に記載のアルカリ法で遺伝子を抽出した。

7. ドットプロットスクリーニング

(1) 抽出した遺伝子は、Bio Dot (バイオラッド製) を用いて各々2枚のナイロンメンブラン (ミリポア製) に結合させ、水酸化ナトリウム水溶液で遺伝子を変性させた後、UVクロスリンク (ストラタジーン製) により固定を行った。遺伝子の変性は以下の条件で行った。

① 0.1M水酸化ナトリウム、0.15M塩化ナトリウム溶液に20秒反応させ
② その後、0.2M Tris-Cl (pH 7.5)、0.15M水酸化ナトリウム溶液と2分間反応させた。

③ その後、2xSSCで2分間反応させた。

(2) 2. で作製した肝癌polyA RNA及び正常肝臓polyA RNAより、放射性CTP (α -³²P-dCTP) (アマシャム製) を用いてAMV逆転写酵素 (生化学工業社製) により逆転写反応を行うことで、それぞれのpolyA RNAからcDNAプローブを作製した。

(3) (1) でナイロンメンブランに固定した遺伝子と (2) で作製したcDNAとを以下の条件でハイブリダイゼーションさせた。

①プレハイブリダイゼーション条件

5 x S S C

5 x Denhardt's

0. 1Mピロリン酸ナトリウム (pH 6. 8)

50%ホルムアミド

0. 5%SDS

100 μ g/ml酵母tRNA100 μ g/ml変性サケ精子DNA

反応温度 42°C

反応時間 1時間

②ハイブリダイゼーション条件

5 x S S C

5 x Denhardt's

0. 1Mピロリン酸ナトリウム (pH 6. 8)

50%ホルムアミド

0. 5%SDS

100 μ g/ml酵母tRNA100 μ g/ml変性サケ精子DNA(2) で作製したcDNAプローブ (5 x 10⁵ cpm/ml)

反応温度 42°C

反応時間 16時間

(5) その後、ナイロンメンブランを各々500mlの2x S S C (0. 1% SDSを含む)、0. 2x S S C、0. 1x S S Cの溶液の順番でそれぞれ30分間ずつ60°Cで洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。結果を図1に示す。得られたオートラジオグラフィーより、正常肝臓のcDNAプローブとの結合量に比べ肝癌のcDNAプローブとの結合の多い遺伝子を選択した。全部で

少なくとも 31 確認した。このうちの 1 つを選択し、以下の実験に用いた。

8. 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、『Molecular Cloning Second Edition』chapter 13 に記載の方法に準じて行った。実際には、得られた肝癌の cDNA プローブとの結合量の多い遺伝子の塩基配列の決定は、T7 sequence kit™ (ファルマシア製) を用いてジデオキシタミネイター法で pBluescript II 上に挿入した遺伝子部分の配列を読み取った。

9. ホモロジー解析

決定された遺伝子の塩基配列を DDBJ (DNA Data Base of Japan) のデータバンクに照会することで、ホモロジー解析を行った。その結果、上記の 3 つの遺伝子は、ホモロジーの見つからない新規遺伝子であることが判明した。これらの遺伝子をそれぞれ、HRPI 遺伝子と命名した。遺伝子について、該遺伝子が完全長であるかどうか確認するために以下の解析を行った。

10. cDNA ライブライマーの作製

DEN 投与後 7 カ月の肝癌組織より抽出した polyA RNA 4 μg から ファルマシア製タイムセイバー cDNA シンセシスキット™ を用いて、取扱い説明書にしたがって cDNA 合成を行った。以下にその概要を説明する。

(1) ランダムプライマーを使用し、逆転写反応、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応により二本鎖 cDNA を合成し、この cDNA の両端に NotI / EcoRI アダプターを付加するため T4 DNA ライゲース処理及びポリヌクレオチドキナーゼ処理を行った。これにより両端に EcoRI 制限酵素切断部位を有する cDNA を得た。

(2) この cDNA を、λgt11 クローニングベクター (ファルマシア製) に T4 DNA リガーゼを用いて挿入し、GIGAPACK Gold™ (ストラタジーン製) を用いてパッケージングを行い、λ ファージの中に cDNA を導入

し、遺伝子の単離に用いた。

11. 遺伝子の単離

遺伝子の単離は『Molecular Cloning Second Edition』Chapter 2に記載の方法に準じて行った。以下にその概要を示す。

(1) 10. で作製したcDNAを含むライブラリーをY1090r-大腸菌に接触させた後、0.7%寒天を含むNZY培地に混合し、1.5%寒天を含むNZY培地プレートに撒いた。42°Cで6時間培養を行うことでcDNAを大量に含むplaquesを形成させた後、このプレート上にニトロセルロースフィルター(イモビロン(ミリポア社の登録商標)、ミリポア製)をのせplaqueを転写した。

(2) このフィルターを水酸化ナトリウムでplaque中のcDNAを変性させた。変性の条件は7. (1)に記載の条件と同じで行った。

(3) 変性させたcDNAを75°Cで2時間熱処理して固定し、ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションに用いたプローブには、8. で塩基配列を決定したHRPI遺伝子の一部分をランダムラベリング(ベーリンガーマンハイム製のランダムラベリングキットを使用した)で³²P-dCTP標識したものを用いた。ハイブリダイゼーションの条件及び洗浄の条件は文献に記載の条件にしたがった。

(4) ハイブリダイゼーションの結果、フィルターに固定したcDNAから得られたポジティブシグナルに対応するplaqueからプローブ配列より長い配列を有する。

(実施例2) 肝癌特異的な蛋白質HRPIのアミノ酸配列及び該蛋白質をコードする遺伝子の決定

1. 遺伝子の大量調製

HRPI遺伝子について以下の操作を行い、遺伝子を大量調整した。

(1) 実施例1の11. (4) 又は (5) でNZY寒天培地上に形成させたブラークから回収した入ファージをSM溶液に懸濁した。

(2) (1) の懸濁液50μlとY1090r-大腸菌20μlを混合し、37°C、15分間放置した。

(3) その後、100μg/mlアンピシリンを含む10mlNZY培地に(2)で混合した溶液を移し、37°Cで6時間培養した。

(4) 8000rpm、5分間遠心分離し、上清を回収した。

(5) 該上清に、5M NaClを1ml、ポリエチレングリコール6000を1.1gを加え、溶かした。

(6) 該溶液を氷上に1時間置き、その後10000rpm、4°Cで20分間遠心分離を行った。

(7) 沈殿を回収し、700μlのSM溶液に懸濁した。

(8) クロロホルムを500μl加えて攪拌し、残った大腸菌を溶かした。

(9) 5000rpm、10分間遠心分離し、水層を回収した。

(10) これに、1mg/ml RNase A、5mg/ml DNase I(共にシグマ製)を各1μlずつ加え、37°Cで1時間放置したのち、20%ポリエチレングリコール6000(0.8M NaCl)を600μl加え、氷上に30分間放置した。

(11) 4°Cで、15000rpm、20分間遠心分離した後、沈殿を回収した。

(12) この沈殿に500μlのSM溶液、50μlの5M NaCl、50μlの0.5M EDTAを加え、更に、400μlのフェノールを加えて攪拌し、ファージを溶かしてcDNAを遊離させた。

(13) 該溶液を室温で15000rpm、5分間遠心分離した後、水層を回収した。該液に1mlのエタノールを加え、15000rpm、20分間遠心分離し、液層を捨てた。

(14) 70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し、100μlのTE溶液 (Tris-Cl pH 8.0 10mM、1mM EDTA) に沈殿を溶かし、DNA溶液を得た。

2. HRP I 遺伝子のベクターへの挿入

HRP I 遺伝子を以下の操作により、ベクターに挿入した。

(1) DNA切断の系を以下のようにし、制限酵素Not I (宝酒造製) によるDNA切断を行った。

DNA溶液 (1. で調製したもの)	20 μl
0. 1%BSA	10 μl
0. 1%Triton X 100	10 μl
Not I (宝酒造製)	2 μl
RNase A (日本ジーン製)	1 μl
10xH buffer (Takara製)	10 μl
滅菌水	47 μl
	合計 100 μl

反応温度 37°C

反応時間 4時間

(2) その後、0.7%NuSieve (登録商標) GTGアガロース (宝酒造製) 電気泳動を行い、1.6kbp付近のDNAを切り出し、このDNAをGENE CLEAN II (登録商標、フナコシ製) を用いて取扱説明書の通りにDNAを回収した。

(3) DNAを組み込むpBlue script II (ストラタジーン製) にNot Iで切断後脱リン酸化を行った。

①Not Iでの切断は、以下の系で行った。

pBlue script II (1 μg/μl)	3 μl
10xH buffer	2 μl

0. 1% B S A	2 μ l
0. 1% Triton X 100	2 μ l
Not I	2 μ l
滅菌水	10 μ l
	合計 20 μ l

反応温度 37°C

反応時間一晩

②その後、2 μ l 1M Tris pH 8.0を加え、1 μ l Bacterial Alkaline Phosphatase (宝酒造製)を加え、65°Cで1時間放置した。

③その後、フェノール/CHCl₃抽出を常法に従い2回行い酵素を失活させた後、エタノール沈殿により精製した後、TE溶液にて100ng/ μ lに溶かした。

④②で得られたDNAと、③で得られたpBluescript IIを、以下の系で反応させ、DNAをベクターに挿入した。

DNA ((2)で調製したもの)	5 μ l
pBluescript II Not I 切断物 (③で調製したもの)	1 μ l
10倍ライゲーションバッファー (日本ジーン製)	2 μ l
T4リガーゼ (日本ジーン製)	1 μ l
滅菌水	11 μ l
	合計 20 μ l

反応温度 16°C

反応 2 時間

3. 遺伝子の大腸菌への導入

2. で作製したHRPIを挿入したベクターを挿入したベクターを、それぞれ常法に従い反応液を全て、E. coli JM109コンピテントセル (宝酒造製)

に混合し、氷上で30分間、42°Cで45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC培地900μlを加え、37°C、1時間置き、ベクターをE. coli JM109に導入した。その後、E. coli JM109を回収した。

なお、このHRPI遺伝子を導入した組み換え体大腸菌を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託（受託番号FERM P-15164）、平成8年9月11日国際寄託に移管した（受託番号 FERM BP-5663）。

4. 遺伝子の塩基配列の決定

(1) 3. で回収したE. coli JM109をLB寒天培地(100μg/mlアンピシリン、0.1 mM IPTG、0.004%X-gal含有)に撒き、37°Cで16時間培養した。

(2) 形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを2ml LB培地(100μg/mlアンピシリン含有)に植え、37°Cで16時間培養した

(3) その後、12000 rpm、1分間遠心分離して集菌し、Magic Miniprep(登録商標、プロメガ製)に従いプラスミドDNA溶液を回収した。

(4) 回収したDNAをダイターミネーターFSシークエンシングキット(Dye terminator FS Sequencing kit)(パーキンエルマー社製)を用いて、下記の要領でシークエンスした。

①キットに添付の説明書に従い、前記DNAをシークエンスサンプルに調製した。

②下記組成の系でキットの説明書に従い、DNAのPCR反応を行った。

鋳型DNA 600μl

プライマーDNA 3.2pmol

シークエンスマックス(Sequence mix) 8 μl

合計反応溶液が20μlになるように滅菌蒸留水を加えた。

プライマーは自作のものを使用した。

③PCR反応物をフェノール／クロロホルム抽出した。

④抽出物をエタノール沈殿にて精製し、乾燥した。

⑤生成物を3μlの3%ブルーデキストラン、50mM EDTA、80%ホルムアミド溶液に溶解し、95°Cで2分間変性した後、氷冷し、シークエンス用サンプルとした。

⑥得られたサンプルを、373ストレッチDNAをシークエンサー（373 Stretcher DNA Sequencer）（パーキンエルマー社製）にて解析し、塩基配列を決定した。

HRPI遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号2に示した。

繰返し、4. (3)で回収したDNAをシークエンスし、HRPI遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号2に記載される配列であることを確認した。

5. アミノ酸配列の決定

4. で決定した塩基配列から、HRPIのアミノ酸配列を決定した。HRPIのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

(実施例3) 肝癌の遺伝子発現レベルでの診断の可能性の確認

HRPI遺伝子のノーザンプロットハイブリダイゼーション法による解析を、『Current Protocols in Molecular Biology』(1987年、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience社) Chapter 4に記載されているホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動を用いる方法に従い行った。用いたpolyA RNAの量は、各サンプルにつき500ngで、①正常肝臓及びDEN投与後7ヶ月の肝癌のpolyA RNAを用いたもの、②1. で調製した肝癌飼料の全てのpolyA RNAを用いたものの2種類について行った。

(1) 実施例2のI. 2. でpBluescript II上にのせたHRPI遺伝子を制限酵素処理にて、ベクターから切り出した。

(2) その後、制限酵素処理液をアガロースゲル電気泳動にかけて、目的とするH R P I 遺伝子を分離した。

(3) (2) で分離したH R P I 遺伝子を GENE CLENE II (登録商標、フナコシ製) を用いて精製した。

(4) 精製したH R P I 遺伝子をランダムプライムドDNAラベリングキット(ペーリングガーマンハイム製)を用いて製品取扱説明書に従い、 α -P 32 d CTP (アマシャム製) を用いて 32 P-d CTP標識したH R P I 遺伝子プローブを作製した。

(5) (4) で作製したプローブを用いて、まず正常肝臓と7カ月肝癌を用いた系において、ノーザンプロットハイブリダイゼーション法による解析を行った。この結果、肝癌で有意に増加する遺伝子としてH R P I 遺伝子が検出された。これよりH R P I 遺伝子を用いることで、肝癌と正常肝臓の識別が可能となること、すなわち、肝癌の発症のモニターが可能となること、さらには肝癌の診断が可能であることが判明した。

(6) 次に、同じプローブを用いて、1. で調製した肝癌飼料全ての poly A RNAを用いたものを使用した系でノーザンプロットハイブリダイゼーション法解析を行ったところ、発癌誘導に伴いH R P I 遺伝子の有意な増加が見られることが判明した(図2)。このことから、H R P I 遺伝子を用いて発癌初期の肝癌の識別も可能であること、すなわち肝癌の進行程度のモニターが可能であること、さらには肝癌の早期診断が可能であることが判明した。

(実施例4) H R P I 部分蛋白質の発現

1. 組み換え大腸菌の作製

実施例1の8で取得したH R P I 遺伝子の部分長クローン(配列表の配列番号1の185-299番目のアミノ酸をコードする部分)をヒスチジンタグを導入したp E T 3 aベクター(図3)に組み込んだ後、大腸菌B L 2 1 (D E 3) p L y s Sに導入した。

2. H R P I の作製

(1) 1. で作製した大腸菌をアンピシリン 100 μ g/ml を含む LB 培地で培養し、分光光度計（ベックマン製）で測定した濁度が 600 nm の波長で 0.5 になった時点で、0.5 mM になるように IPTG を加え H R P I 蛋白質の発現誘導を行った。

(2) 2 時間後、大腸菌を回収し、Lysis Buffer に懸濁した後、ソニケーションし、Beckman Optima XL-80 を使用し、50.2 Ti ローターで 18000 rpm、4°C。15 分間遠心分離した。

(3) この後、沈殿物を 6 M 塩酸グアジニンに溶解し、Ni-アガロース（キアゲン製）を用いて、取扱い説明書の通りに精製した。

3. SDS-PAGE 電気泳動

精製された標品の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、クマシーブリリアントブルーで染色し、精製がうまく行われたことを確認した。結果を図 4 に示す。

(実施例 5) H R P I 全長蛋白質の発現

1. H R P I 遺伝子の大量調整

(1) 組み換えベクターの作製

H R P I 遺伝子を図 5 に示されるヒスチジンタグを導入した pBlueBac III ベクター（インビトロゲン製）に組み込んだ。以下にその詳細を記す。

1) まず、実施例 2 の 2. で作製した H R P I 遺伝子を挿入した pBluescript II ベクターを、PCR 法 (『Current protocols in molecular biology』 (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987) chapter 15 に記載) により、次の式 (1) 及び式 (2) の塩基配列のプライマーを用いて、H R P I 遺伝子の第一メチオニン部分をコードする塩基配列を Nde I 認識部位として増幅した。

5' GAA TTC CAT ATG TTC TAT ATA CAG AG
T TCT GAG GC 3' ···式(1)

5' TCC AGT TAG TGA CGT CTG ATG 3'
···式(2)

2) 増幅された遺伝子をNdeI及びBamHI(共に宝酒造製)でカタログの条件通りに切断した。

3) 別に、実施例2の2.で作製したpBluescriptII上のHRP遺伝子をBamHI及びSacI(共に宝酒造製)でカタログの条件通りに切断した。各々の切断された遺伝子は、アガロース電気泳動及びGENE CLEAN II(登録商標、フナコシ製)を用いて目的部分のみを精製した。

4) 2)及び3)でそれぞれ作製した遺伝子をLigation Pack(日本ジーン製)を用いてその取扱説明書に従い連結した。

5) EcoRI/NdeI/EcoRIアダプター(5' AATTCCATA TGG 3')をDNA合成機で合成し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造製)を用いて説明書にしたがいリン酸化した。

6) BluescriptIIをEcoRIで切断し、5)で作製したEcoRI/NdeI/EcoRIアダプターを切断部位に組み込んだ。

7) 6)で作製したベクターのNdeI、SacIを切断し、4)で作製した遺伝子を該部位に組み込んだ。

8) 該ベクターを大腸菌JM109に常法に従い導入し、該ベクターが挿入された大腸菌を、LB培地(アンピシリン100μg/ml含有)で培養した。

9) 培養した大腸菌から、Magic Miniprep(プロメガ製、登録商標)を製品説明書に従って用いて、目的のベクターを精製した。

10) 該ベクターをNdeIで切断後、Ligation Packを使用してNdeI NcoIリンカー(5' TATCCATGG 3')と連結し、ベクターの両切端をNcoIとした。

11) 該ベクターのH R P I 遺伝子部分のN c o I サイトを制限酵素で切断し、両端がN c o I であるH R P I 遺伝子を作製した。

12) これを常法によりアガロース電気泳動後、G E N E C L E A N I I を用いて目的部分のみを精製した。

13) 図5に示すヒスチジンタグを導入したp B l u e B a c I I I ベクター(インビトロゲン製)を常法によってN c o I で切断した後、脱リン酸化処理を行った。

14) 10) で精製したH R P I 遺伝子と11) で作製したベクターとを、L i g a t i o n P a c k (日本ジーン製)を用いてその取扱説明書に従い連結した。

なお、上記各過程でのベクター又は大腸菌に組み込まれた遺伝子の確認は、挿入断片の塩基配列を読み取って行った。

(2) H R P I 遺伝子の大量調整

H R P I 遺伝子を組み込んだプラスミドを『M o l e c u l a r C l o n i n g S e c o n d E d i t i o n』(C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、1989) c h a p t e r 1 に記載の方法で大量調製した。なお、プラスミドの精製には同書記載の超遠心分離を用いたが、その回数は3回行った。

2. H R P I 全長蛋白質の発現

(1) 大量調製したプラスミドをリポフェクション法 (D O T A P (登録商標、ベーリンガーマンハイム製)) によってS f 9 細胞に導入した。

(2) 得られた組み換え体ウィルスを再びS f 9 細胞に感染させ、大量発現させた。リポフェクション後のS f 9 細胞の扱いや、組み換え体ウィルスの作製、蛋白質の大量発現等の方法は、すべてM A X B A C (登録商標、インビトロゲン製)の製品説明書に従い行った。

(3) H R P I を発現させたS f 9 細胞はS D S s a m p l e b u f f e

rに懸濁させ、5分間ボイルした後、SDS-PAGE電気泳動にかけた。その後、クマシーブリリアントブルーで染色した結果、HRPIのバンドが検出された。図6に、SDS-PAGE電気泳動の結果を示す。

(実施例6) 抗HRPI抗体の作製

1. 抗HRPI抗体の作製

実施例4で作製したHRPI部分蛋白質を『Antibodies A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) chapter 5に記載の方法にしたがってウサギに免疫し、抗HRPI抗体を作製した。

2. ウェスタンプロット

『Current protocols in molecular biology』(Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987) chapter 1に記載の方法にしたがって行った。

(1) 実施例4で作製したHRPI部分蛋白質及び実施例5で作製したHRPI完全長蛋白質をそれぞれウェスタンプロットを行った。

(2) その後、抗HRPI抗体を該HRPI部分蛋白質又はHRPI完全長蛋白質とそれぞれ反応させた。二次抗体としてアルカリフェオスファターゼで標識された抗ウサギIgG抗体を反応させ、さらに該アルカリフェオスファターゼを基質(NBT、BCID(共にプロメガ製))と反応させ呈色させた(図7A)。これより抗HRPI抗体がHRPIと反応することが確認された。なお、図7Aでは、組み換え体HRPIがヒスチジンタグ分だけ分子量が大きくなっていることが見られる。

(実施例7) HRPIの肝癌の診断への利用の検討

(1) 実施例1で作製した各種肝癌組織1gを5mlの2xSDS sample bufferでホモジナイズした後、3分間ボイルすることで肝癌組織抽

出液を得た。

(2) 該抽出液を 12.5% SDS-PAGE 電気泳動にかけた後、ウェスタンプロットを行った。なお、蛋白質量は、別に同様の電気泳動を行ったゲルをクマシーブリリアントブルーで染色したのち、比色することで揃えた。

(3) その後、実施例 6 で作製した抗 HRP I 抗体を該抽出液と反応させた。二次抗体としてアルカリフェオスファターゼで標識された抗ウサギ IgG 抗体を反応させ、さらに該アルカリフェオスファターゼを基質 (NBT、BCID (共にプロメガ製)) と反応させ呈色させた (図 7B)。この結果、ノーザンプロットハイブリダイゼーション法の結果と同様に、肝癌及び肝癌発現過程で有意な HRP I 蛋白質の増加が確認された。すなわち、該抗体は、肝癌と正常肝臓の識別および発現過程の肝臓と正常肝臓の識別が可能であり、肝癌の発症のモニター、肝癌の早期診断等に使用できることが確認された。

(実施例 8) HRP I 遺伝子の組織間分布の確認

組織間分布の確認には、Rat MTN Blot (クローンテック製、登録商標) を用いた。この製品は、上述のノーザンプロットハイブリダイゼーションを行うために市販されている、ラット各組織の polyA RNA をプロットしたメンブランである。このメンブランを『Molecular Cloning Second Edition』 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) pp 7. 3-7. 84 に記載の方法、及び製品取り扱い説明書に従い前述の HRP I 遺伝子プローブを用いてそれぞれノーザンプロットハイブリダイゼーションを行った。

HRP I 遺伝子プローブの結果を図 8 に示す。結果から明らかかなように、HRP I 遺伝子は肝臓及び腎臓で強く発現していて、他に肺でも発現している。

産業上の利用可能性

本発明で明らかにした HRP I 又は HRP I 遺伝子を肝臓から検出することで

肝癌の進行程度のモニター、肝癌の診断、特に早期肝癌の診断方法の開発が可能となる。

また、本発明で明らかにしたH R P I 遺伝子の一部又は全部を用いることで肝癌の発症を遺伝子の発現レベルで診断する診断試薬、診断方法の開発が可能となる。

また、本発明に係る抗H R P I 抗体を用いることで、肝癌の発症を免疫組織学的に診断する方法の開発することが可能となる。

さらに、将来的には該遺伝子、該遺伝子のアンチセンス遺伝子や該抗体を用いた肝臓癌治療薬、治療方法への応用が可能となる。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：295

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

Met	Phe	Tyr	Ile	Gln	Ser	Ser	Glu	Ala	Leu	Gln	Ile	Leu	Lys	Asn	Ser
1															
Leu	Arg	Lys	His	Leu	Pro	Glu	Ser	Leu	Lys	Val	Tyr	Gly	Thr	Val	Phe
20															
His	Met	Asn	Gln	Gly	Asn	Pro	Phe	Lys	Leu	Lys	Ala	Val	Val	Asp	Lys
35															
Trp	Pro	Asp	Phe	Asn	Thr	Val	Val	Ile	Arg	Pro	Gln	Glu	Gln	Asp	Met
50															
Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	His	Tyr	Asn	Ile	Thr	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Lys
65															
Asp	Pro	Lys	His	Cys	Gln	Glu	Phe	Leu	Gly	Ser	Ser	Asp	Val	Thr	Asn
85															
Trp	Lys	Gln	His	Leu	Gln	Ile	Gln	Ser	Ser	Gln	Ala	Asp	Leu	Gly	Lys
100															
Val	Ile	Glu	Asn	Leu	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Lys	His	Lys
115															
120															
125															
Gln	Cys	Phe	Leu	Tyr	Met	Val	Ser	His	Thr	Ala	Lys	Lys	Leu	Thr	Pro
130															
135															
140															

Ser Leu Val Asp Ala Lys His Leu Val Ile Ser Ser Glu Lys Pro Thr
 145 150 155 160
 Pro Phe Asp His Gln Leu Phe Lys Phe Ala Arg Leu Asp Val Lys His
 165 170 175
 Ala Ala Leu Val Asn Ser Ile Trp Tyr Phe Gly Gly Asn Glu Lys Ser
 180 185 190
 Gln Lys Phe Ile Glu Arg Cys Ile Phe Thr Phe Pro Ser Val Cys Ile
 195 200 205
 Met Gly Pro Glu Gly Thr Pro Val Ser Trp Ala Leu Met Asp His Thr
 210 215 220
 Gly Glu Leu Arg Met Ala Gly Thr Leu Pro Lys Tyr Arg His Gln Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Tyr His Val Ala Phe His Gln Val His Thr Leu Glu Lys Leu
 245 250 255
 Gly Phe Pro Met Tyr Leu His Val Asp Lys Val Asn Leu Thr Ile Gln
 260 265 270
 Arg Met Ser Ala Val Leu Gly His Val Pro Met Pro Cys Thr Trp Asn
 275 280 285
 Gln Trp Asn Trp Val Pro Leu
 290 295

配列番号：2

配列の長さ：1635

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ACAGATTAT AGGTATTAGA AGAG ATG TTC TAT ATA CAG AGT TCT GAG GCA CTG	54
CAG ATT CTG AAG AAT TCC CTA AGG AAG CAC CTC CCT GAG TCC TTA AAG	102
GTT TAT GGG ACT GTC TTC CAC ATG AAC CAG GGA AAC CCA TTC AAG CTC	150
AAG GCT GTA GTG GAC AAG TGG CCT GAT TTT AAT ACT GTT GTT ATT CGA	198
CCA CAG GAA CAG GAC ATG ACA GAT GAC CTT GAC CAC TAC AAC ATC ACT	246
TAC CTA ATT TAT TCC AAG GAT CCC AAG CAC TGT CAG GAA TTC CTT GGC	294
TCA TCA GAC GTC ACT AAC TGG AAA CAA CAT TTG CAG ATC CAA AGT TCA	342
CAG GCA GAC CTG GGC AAA GTG ATA GAA AAC CTT GGA GCC ACT AAC TTG	390
GGC AAG GTC AAG CAT AAG CAG TGC TTT CTC TAT ATG GTA TCT CAT ACA	438
GCA AAG AAA CTG ACT CCT TCC TTG GTG GAT GCA AAG CAC TTA GTA ATC	486
AGC AGT GAG AAA CCC ACG CCT TTT GAC CAT CAG TTA TTC AAA TTT GCC	534
CGC CTG GAT GTT AAG CAT GCT GCA TTG GTG AAT AGC ATC TGG TAT TTT	582
GGT GGC AAT GAG AAA AGC CAG AAG TTC ATT GAA CGC TGT ATC TTT ACC	630
TTT CCC AGC GTC TGT ATT ATG GGC CCT GAG GGG ACC CCT GTG TCC TGG	678
GCC CTG ATG GAT CAC ACT GGA GAA CTA AGA ATG GCA GGC ACC TTG CCT	726
AAG TAC CGG CAC CAG AAC CTC ATT TAC CAT GTT GCT TTT CAC CAG GTC	774
CAT ACA CTA GAG AAG CTG GGC TTT CCC ATG TAT TTA CAT GTG GAT AAG	822
GTT AAC CTC ACC ATT CAG AGA ATG TCT GCT GTG CTG GGC CAT GTC CCC	870
ATG CCC TGT ACC TGG AAC CAG TGG AAC TGG GTA CCT CTC TAA AGCCAGAAAA	922
GAGTGAGAGG GGGACTGCAC TTGTAGATGG AGAAATGGCT GAGTGAACAG AGAGAAGTGA	982
ACTGTCATTA GGGTGGTGTG TGTTCTAGA GAGCAGGGTT GCATCACACT GAGCTGCACA	1042
CAGTTCTTC GCCCTCACAT TGCTCATGCT CTTAATTCCA TTTCTCAGCA TACAGAAGGC	1102
CACCATGTCC TGCTCCCACA TTCTCAGGAT TCCTGTAACA CATTGGCTA AATTGTACTC	1162
TCTCCTATTG ATTTGCAGG CTCATTGATC CATGGCTATT AGTCAGTAGG TTTGTTTGT	1222

GACCTGACCC CCCACAACCC TGCACACAGG CATACTTCCT CTGGCTTCT GTAGCTTG	1282
TTTTATGGGT TGGAGAAGTT TGTTCTCATG TCACTCACCA GACATTAAT TGTTAATATG	1342
TAAAAACTAC TATACATGCA AACACAGATA CACAGTATGT GTGGTACAAC TGTAAGAATT	1402
GTTAGAAAAG AGACTAGAGC TCAGCAAGTA AATGTGCCTG CAGTCAAGCC TGGTAACCTG	1462
AATTGATTC CTGGGAACCA CATTGTAAAAA GGAGAGAATC TATTCCATCG ACTTGTCCCTC	1522
TAACCTCCCC AGGTATGGGG CGCATGTGCA CACACAAATA AGTAAATGTA ATCTTTAAC	1582
AGTTAAAAAG ACTAACTGGT GATCTTGAG ACTAGATTG TATTTTTT TTC	1635

配列番号：3

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

配列

GAATTCCATA TGTTCTATAT ACAGAGTTCT GAGGC

配列番号：4

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

配列

TCCAGTTAGT GACGTCTGAT G

請求の範囲

1. 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質。
2. 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されているアミノ酸配列からなり、かつ該蛋白質の肝臓組織における発現が、正常細胞に比べて癌細胞において増加していることを特徴とする蛋白質。
3. 請求項1又は2に記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるDNA。
4. 請求項1又は2に記載の蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列を含んでなるDNAであって、かつ該DNAが該蛋白質の全部をコードするRNAとハイブリダイズすることを特徴とするDNA。
5. 配列表の配列番号2で表される塩基配列を含むDNA。
6. 配列表の配列番号2で表される塩基配列の25番目のAから912番目のAまでの塩基配列を含むDNA。
7. 請求項1又は2に記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り且つGC含有率が30～70%であるDNA。
8. 化学修飾された請求項3～7のいずれか一つに記載のDNA。
9. 請求項3～7のいずれか一つに記載のDNAのアンチセンスDNA。
10. 請求項1又は2に記載の蛋白質をコードする塩基配列を含んでなるRNA。
11. 請求項1又は2に記載の蛋白質をコードする塩基配列のうちの連続する12塩基以上から成り、且つGC含有率が30～70%であるRNA。
12. 化学修飾された請求項10～11に記載のRNA。
13. 請求項10～11に記載のRNAのアンチセンスRNA。
14. 請求項1又は2に記載の蛋白質に特異的に反応する抗体。
15. 請求項1又は2に記載の蛋白質を検出する方法であって、請求項14に記載の抗体を用いる方法。

16. 請求項1又は2に記載の蛋白質をコードするRNAを検出する方法であつて、請求項3～8のいずれかに記載のDNAをプローブとして用いることを特徴とする検出方法。

图 1A

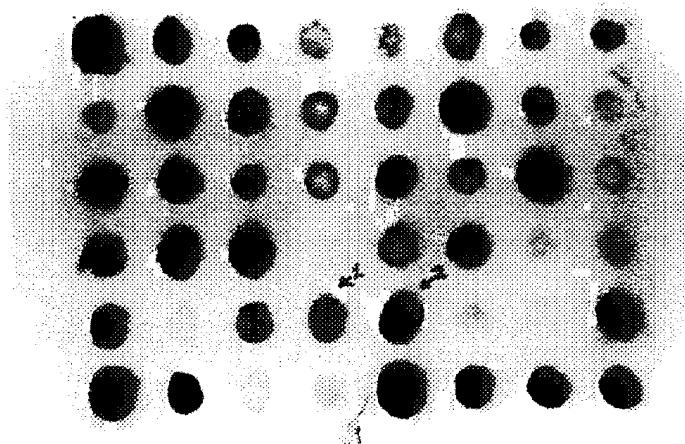
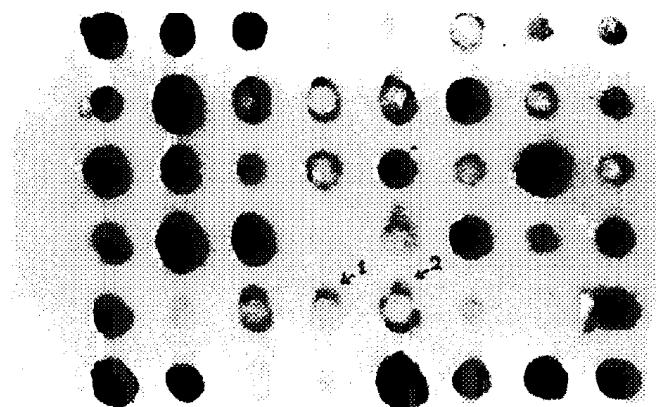


図 1 B

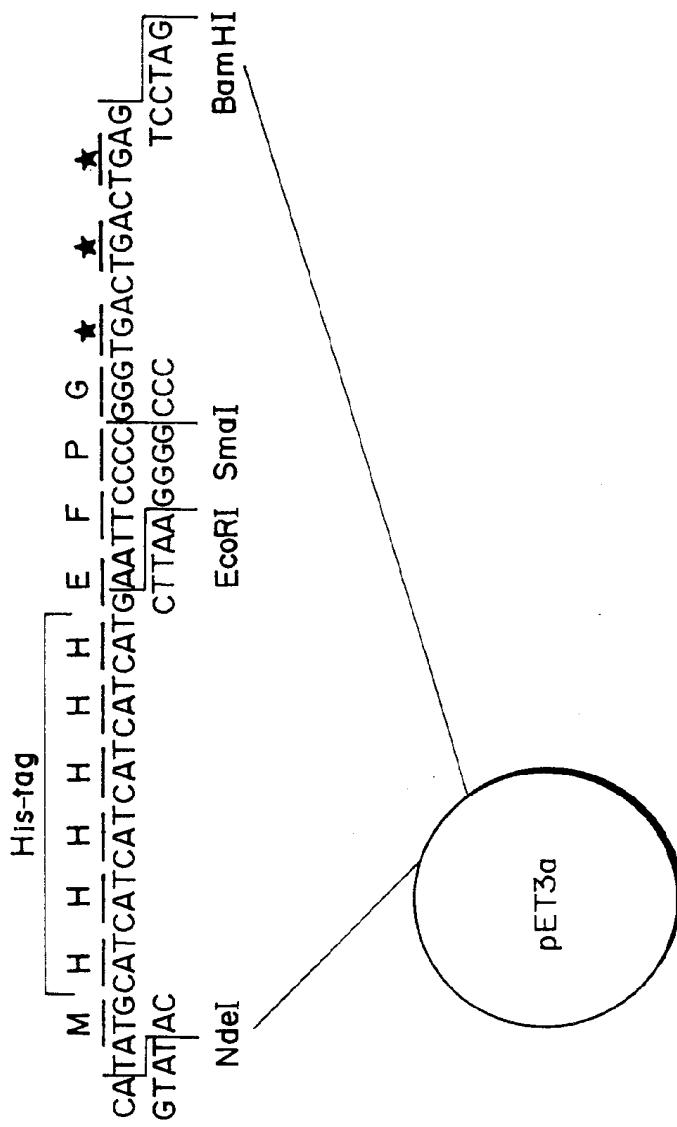


☒ 2

1 2 3 4 5 6 7 8

← 9

[X] 3



☒ 4

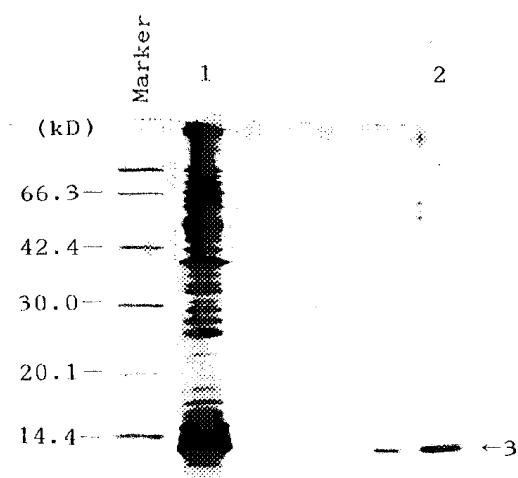


FIG 5

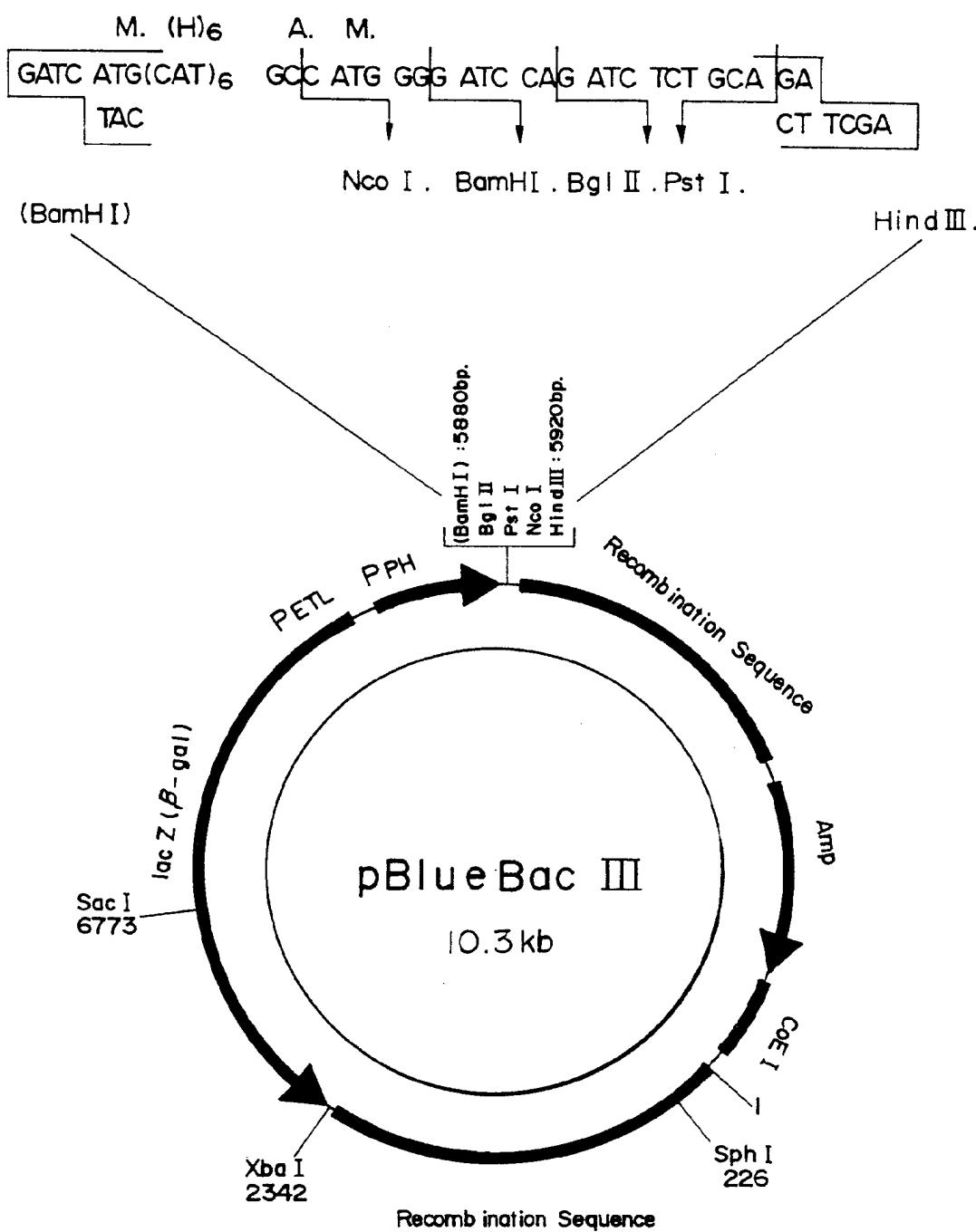


図6

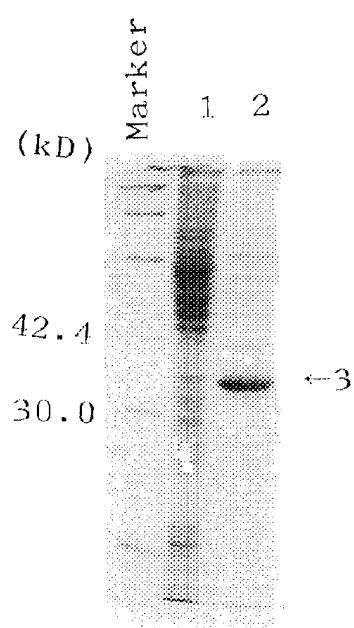


図 7 A

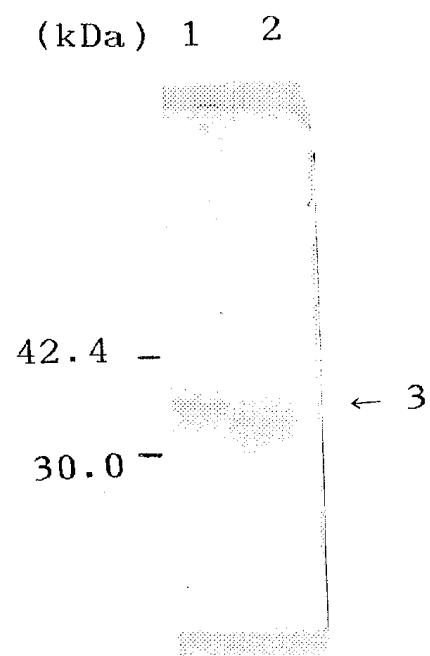


图 7 B

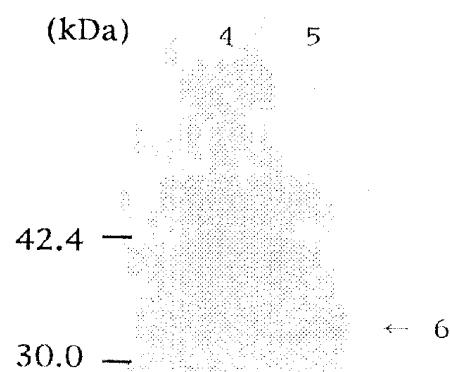
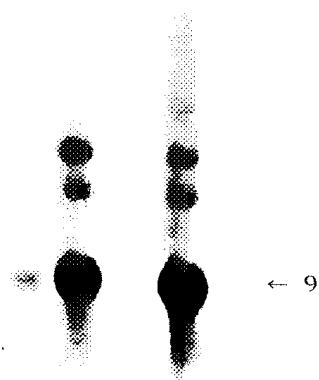


図 8

1 2 3 4 5 6 7 8



10/10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C07K14/82, C07K16/18, C12N1/21, C12N5/16, C12N15/11, C12P21/02, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574//(C12N1/21, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC C12R1:19)

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C07K14/82, C07K16/18, C12N1/21, C12N5/16, C12N15/11, C12P21/02, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), REGISTRY (STN), CA (STN), GENETYX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/10333, A1 (Sumitomo Electric Industries, Ltd. and 5th others), March 20, 1997 (20. 03. 97), Claims 29 to 53	1-16
A	Kishimoto T. et al. "Overexpression of Cysteine Sulfinic Acid Decarboxylase Stimulated by Hepatocarcinogenesis Results in Autoantibody Production in Rats" Cancer Res. <u>56</u> (22) (1996), p. 5230-5237	1-16
A	Kishimoto T. et al. "HTF: A B-ZIP Transcription Factor That Is Closely Related to the Human XB/P/TREB5 and Is Activated by Hepatocellular Carcinoma in Rats" Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>223</u> (3) (1996) p.746-751	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search October 9, 1997 (09. 10. 97)	Date of mailing of the international search report October 28, 1997 (28. 10. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02214

A. (Continuation) CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(C12P21/02, C12R1:91) (C12P21/02, C12R1:91)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/02214

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. C12N15/12, C07K14/82, C07K16/18, C12N1/21, C12N5/16, C12N15/11, C12P21/02, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574 // (C12N1/21, C12R1:19) (C12P21/02, C12R1:91) (C12P21/02, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. C12N15/12, C07K14/82, C07K16/18, C12N1/21, C12N5/16, C12N15/11, C12P21/02, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), REGISTRY(STN), CA(STN), GENETYX

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 97/10333, A1 (住友電気工業株式会社 外5名) 20.3月.1997 (20.03.97), 請求の範囲29-53	1-16
A	Kishimoto T. et al. "Overexpression of Cysteine Sulfinic Acid Decarboxylase Stimulated by Hepatocarcinogenesis Results in Autoantibody Production in Rats" Cancer Res. 56 [22] (1996) p.5230-5237	1-16
A	Kishimoto T. et al. "HTF: A B-ZIP Transcription Factor That Is Closely Related to the Human XBP/TREB5 and Is Activated by Hepatocellular Carcinoma in Rats" Biochem. Biophys. Res. Commun. 223[3] (1996) p.746-751	1-16

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.10.97

国際調査報告の発送日

28.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

田中 美奈子

4B 9548



電話番号 03-3581-1101 内線 3449